

München, 1960.

Studien über Thrombusfestigkeit

(m ϵ im TEG)

Inge Sagel

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

STUDIEN ÜBER THROMBUSFESTIGKEIT
(m ϵ im TEG)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Inge Sagel

geb. am 14. 7. 1934

aus

Kusel/Pfalz

1960

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Dozent Dr. med. R. Marx

Korreferent: Prof. Dr. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 3. 1960

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT
GEWIDMET

R. 011
BIBLIOTHECA
LEIDEN

STUDIEN ÜBER THROMBUSFESTIGKEIT

(m ξ im TEG)

	Seite
I Einleitung	1
II Methode	2
III Eigene Untersuchungen	7
A) Untersuchungen zum Thema "m ξ - Serum - Cofaktor"	7
1) Methodologische Vorstudien zum Problem des m ξ - Cofaktors im Serum.	7
a) Untersuchungen über die Haltbarkeit von Fibrinogen- und Thrombinlösungen (Einfluß des Alterns und verschiedener Temperaturen).	8
b) Untersuchungen über die Zweckmäßigkeit der Konservierung von gereinigtem Thrombin mit Antistin.	9
c) Bedeutung des Serumeigenthrombins für die Fibrinogen - Thrombin - Reinsystem - Untersuchungen.	10
2) Untersuchungen über eine Veränderung des Serums bei der Alterung.	10
3) Zum Problem einer pathologischen Alteration der m ξ - Cofaktor - Aktivität in Sera kranker Personen.	12
B) Voruntersuchungen zum Thema des Nachweises von Thrombozyten - Antikörpern und Autoantikörpern mit Hilfe der Konstante m ξ im TEG:	18
1) TEG bei Mischungen gesunden gruppengleichen Blutes	19
2) TEG bei Thrombopenie-Blutproben.	21
C) Wirkung von klinisch verwendeten Antithrombotica auf die Komponente m ξ im TEG	23
Die alpha-Heparin-Präparate "Heparin Novo", Heparin-Na", "Liquemin", das heparinähnliche Präparat Eleparon und die Heparinoide Thrombocid, Heparinoid Geigy, SP 54. Vergleich der Mittel hinsichtlich ihrer gerinnungshemmenden Wirkung (I) und Untersuchungen zur Klärung des Angriffspunktes der Substanzen: An Serumfaktoren (Fibrinogen) (II) oder Thrombozyten (III).	
D) Die Polycarbonsäure "Thrombo-Holzinger" hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Blutgerinnung im TEG.	35
IV Zusammenfassung	39
V Literatur	40



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555206_0074

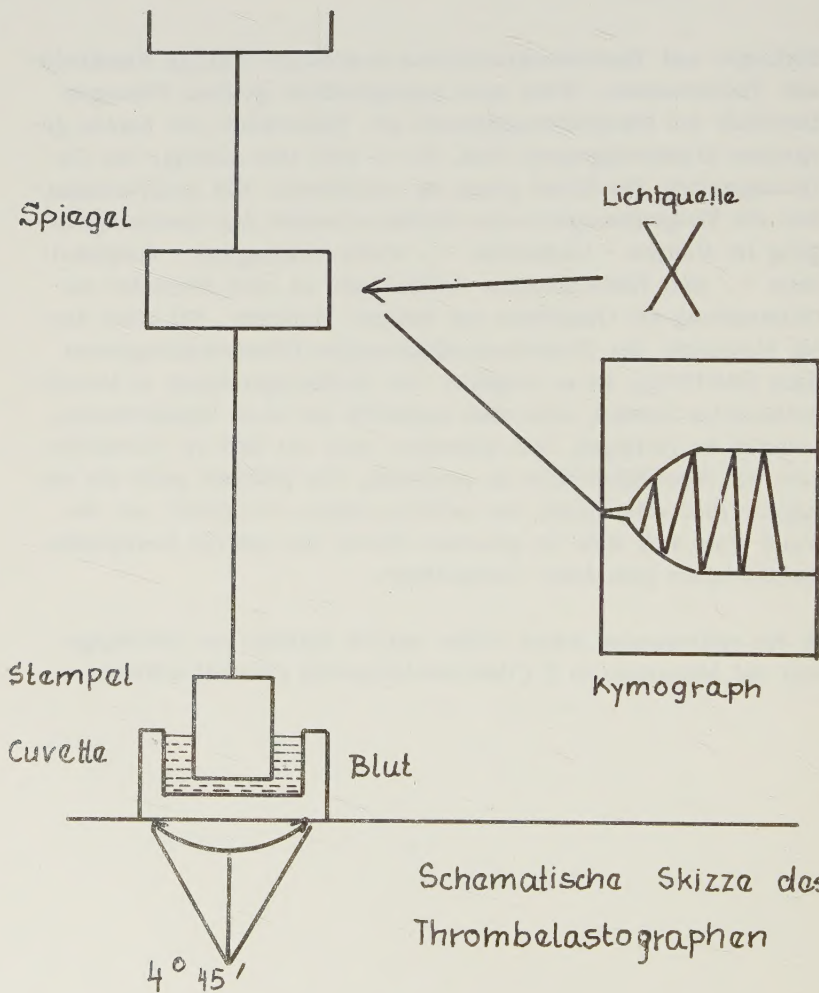
I. EINLEITUNG

Blutungs- und Thrombosekrankheiten sind relativ häufige Krankheits- und Todesursachen. Wenn auch pathogenetisch gesehen Störungen innerhalb des Blutgerinnungssystems nur Teilursachen der beiden genannten Krankheitsgruppen sind, ist es doch sehr wichtig, das Gerinnungssystem des Blutes genau zu analysieren. Die Analysemethoden des Blutgerinnungssystems erfassen entweder den Gerinnungsvorgang im Ganzen - Globalteste -, einen Teilvorgang - Subglobalteste -, oder Einzelfaktoren. Endlich gibt es noch Methoden zur Untersuchung der Qualitäten des fertigen Thrombus. Bei einer dieser Methoden, der Thrombusqualitätsanalyse (Thrombelastogramm nach HARTERT), ist es möglich, den Gerinnungsvorgang in Metallgefäßen im Ganzen, also ohne Rücksicht auf seine Einzelfaktoren, messend zu verfolgen, und außerdem noch ein Bild der Fibrinolyse oder der Pseudofibrinolyse zu gewinnen. Die Methode prüft die Festigkeit (Scherelastizität) der zwischen einem Metallstift und der Wand eines sich stets im gleichen Winkel hin und her bewegenden Stahlbehälters gebildeten Fibrinstränge.

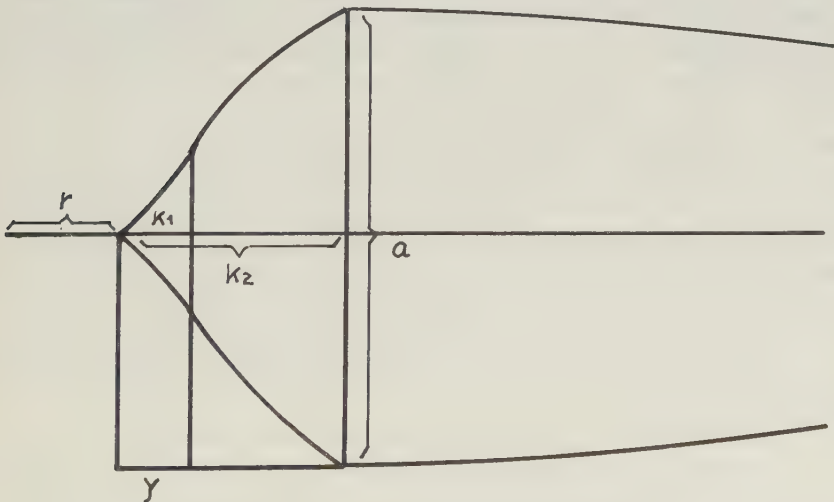
In der vorliegenden Arbeit sollen weitere Beiträge zur Abhängigkeit des Meßwertes m ξ (Thrombusfestigkeit) geliefert werden.

II. METHODE

Der Thrombelastograph, nach den Angaben HARTERT's (Doctorand von H. Schwiegk) von der Firma Hellige gebaut, arbeitet nach folgendem Prinzip:



In eine aus poliertem V A-Stahl bestehende Cuvette, die durch einen Motor regelmäßig in gleichem Winkel im Halbkreis hin- und hergedreht wird, taucht ein freischwebend aufgehängter Metallstempel so ein, daß er den Boden und die Wände der Cuvette nicht berührt. An der Achse des Stempels ist weit oberhalb der Cuvette ein kleiner Spiegel angebracht, der von einer Lichtquelle angestrahlt wird. Der reflektierte Lichtstrahl wird auf einem Kymographion aufgefangen. Bei Drehung des Kymographions ergibt sich zunächst die Markierung einer geraden Linie. In die Cuvette wird nun Blut eingebracht. Solange es nicht geronnen ist, bleibt trotz fortlaufender Drehung der Cuvette die Linie auf dem Kymographion eine Gerade. Mit Beginn der Gerinnung bilden sich Fibrinfäden aus, setzen sich an dem Stempel an und bringen ihn mit wachsender Verfestigung immer mehr zum Mitdrehen in der hin und her rotierenden Cuvette. Dadurch gerät der Spiegel und damit auch die Linie am Kymographion in eine links- rechts- bzw. auf und ab - Bewegung. Es entsteht so eine enge Zickzacklinie, deren Endpunkte die Spindel des Thrombelastogramms ergeben.



Normales TEG

Der maximale Durchmesser dieser Spindel ist ein gewisses Maß für die Thrombusfestigkeit. Wichtig ist auch die Zeit, in der diese größte Amplitude er-

reicht wird. Das Kymographion ist dabei so eingestellt, daß der Lichtstrahl in 1 Minute einen Weg von 2 mm zurücklegt.

TEG - Meßgrößen:

Als Reaktionszeit oder Gerinnungszeit (τ') bezeichnet man die Zeitspanne von Entnahme des Blutes aus der Vene bis zum Beginn der Gerinnung. Sie setzt sich zusammen aus der vom Apparat nicht registrierten Einfüllzeit, (die natürlich gleichförmig möglichst kurz gehalten werden soll und bei routinemäßiger Arbeit 1 - 2 Minuten beträgt) und der Zeit x , die vom Augenblick des Einfüllens bis zum Beginn der Spindelbildung (Erreichung eines Spindeldurchmessers von 1 mm) verstreicht. Bei Verwendung von Zitratblut fällt der Meßbeginn mit dem Augenblick der Rekalzifizierung zusammen. Da die Papiergeschwindigkeit pro Minute 2 mm beträgt, muß die gemessene Strecke durch 2 dividiert werden, wenn man die Minutenzahl errechnen will.

Als Gerinnselbildungszeit k_1 benennt man den Zeitabschnitt von der Beendigung der Reaktionszeit bis zum Erreichen einer willkürlich gewählten Spindelamplitude von 20 mm. Es sei daran erinnert, daß einem mm Kymographion-Strecke eine Zeit von 1/2 Minute entspricht. Die Strecke, die dieser Gerinnselbildungszeit entspricht, trägt die Bezeichnung y .

Ein weiterer Zeitbegriff ist durch den zeitlichen Abstand der Erreichung der größten Spindelamplitude nach Beendigung der Reaktionszeit gegeben ($= k_2$).

Der Durchmesser der größten Amplitude in mm wird als Strecke a bezeichnet.

($m\mathcal{E}$, die maximale "Scherelastizität" bzw. Thrombusfestigkeit, die erreicht wird, soll in folgender Formel einen vergleichbaren Ausdruck finden:

$$m\mathcal{E} = \frac{100 \cdot a}{100 - a}$$

Der Wert von $m\mathcal{E}$ kann in einer dem Gerät beigegebenen Tabelle in Abhängigkeit von a aufgesucht und abgelesen werden:

Normalwerte für TEG - Meßgrößen:

	Nativvenenblut	Venenzitratblut	Venenzitratplasma
r	bis 13 Min.	bis 12 Min.	bis 9 Min.
k ₁	bis 7 1/2 Min.	bis 6 "	2 - 4,5 "
k ₂	30 - 45 "	25 - 35 "	etwa 30 "
m ₂ ϵ	90 - 150 "	85 - 150"	90 - 250 Min. und mehr

Ausführung:

Die Messungen können sowohl mit Nativ-Venenblut wie auch mit Zitratblut und -plasma vorgenommen werden. Das ist vorteilhaft, denn häufig ist der Transport des Blutes vom Krankenbett zum Thrombelastographen zu umständlich und langwierig, so daß die Gerinnungszeit schon beendet ist, ehe die Registrierung begonnen hat.

Bei der Blutentnahme kommt es darauf an, das Blut in seiner natürlichen Gerinnungsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Daher ist auf peinliche Sauberkeit der aus V₂A-Stahl bestehenden Cuvetten und Stempel zu achten. Auch die Kanüle zur Blutentnahme soll aus V₂A-Stahl und innen poliert sein. HARTERT empfiehlt hierfür eine eigene Kanüle mit hochschießbarem Konus, die den Vorteil hat, daß das Blut nicht mit dem Konus in Berührung kommt. Bei Verwendung von Zitratblut und -plasma, die möglichst bald nach der Entnahme erfolgen soll, müssen silikonisierte oder paraffinierte Röhrchen benutzt werden. Zu häufiges Schütteln und Umrühren muß vermieden werden, das Blut soll nicht mit freien Glasoberflächen in Berührung kommen. Das Zitratplasma wird am besten durch Sedimentieren, nicht durch Zentrifugieren gewonnen. Wenn die Senkungsgeschwindigkeit zu klein ist, muß man durch vorsichtiges Zentrifugieren nachhelfen.

Bei der Blutentnahme aus der Armvene werden regelmäßig die ersten Tropfen verworfen, um eine Beimengung von Gewebs-Thrombokinase zu vermeiden. Die Cuvetten werden zu etwa 2/3 ihres Volumens gefüllt (ca. 0,36 ccm). Bei Verwendung von Zitratblut (1 Teil 3,8%ige Natriumzitratlösung und 4 Teile Blut) oder -plasma bringt man genau 0,3 ccm in die Cuvette und rekalkuliert mit genau 0,06 ccm einer 1,29%igen isotonischen Calciumchloridlösung durch Einspritzen mit einer gebogenen Tuberkulinspritze. Dann senkt man den Schwingstift in das Blut ein, gibt Paraffinöl auf die Blutoberfläche, um

sie von der Luft abzuschließen und stellt den zugehörigen Lichtzeiger auf den entsprechenden Kurvenausgangspunkt auf der Skala. Die Registrierung der thrombelastographischen Kurve verläuft dann lichtoptisch automatisch weiter. Später wird der Film in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) Untersuchungen zum Thema "m ϵ - Serum - Cofaktor"

HARTERT hatte folgende Versuchsanordnung gewählt:

Bei Mischung von Fibrinogen, reinem Thrombin, Thrombozyten und Ca - Ionen in optimalen Lösungsverhältnissen wurde jeweils nur ein Thrombus erzeugt, der nicht den normalen Verhältnissen entsprach. Er war locker und schlaff und erhielt erst durch den Zusatz reinen Serums eine etwas höhere Festigkeit. HARTERT, der zunächst den m ϵ -Wert mit dem Retraktionswert weitgehend identifizierte, nannte diesen im Serum enthaltenen Faktor "Retraktions-Cofaktor" und diskutierte hypothetisch die Möglichkeit, daß dieser Faktor ähnlich wie die Faktoren VII und IX aus dem Prothrombinmolekül stamme, weil in seinen Versuchen Serum sich wirksamer erwies als Plasma. Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, daß der m ϵ -Wert Ausdruck der Fibrinfestigkeit und nicht der Retraktion ist, und daß daher der Serum - Cofaktor als ein Komplement der Gerinnselfestigkeit aufzufassen ist (R. MARX).

1) Methodologische Vorstudien zum Problem des m ϵ -Cofaktors im Serum.

Für die Studien zum Problem des m ϵ -Cofaktors im Serum schienen Untersuchungen am Reinsystem eines Fibrinogen - Thrombin-Gemisches am besten geeignet.

Zunächst wurde in mehreren Ansätzen die Haltbarkeit der Lösungen (Einfluß des Alterns und verschiedener Temperaturen) anhand von m ϵ geprüft (a). Ferner wurden Untersuchungen darüber angestellt, ob eine Konservierung von Thrombin mit Antistin den Ausfall von m ϵ beeinflusst (b) und inwieweit der Gehalt von Eigenthrombin des Serums die Untersuchungsergebnisse bestimmen kann (c).

Als Reagenzien wurden gewählt:

Fibrinogen vom Rind (Behring-Werke) und Thrombinum purum (Testthrombin, Behring-Werke). Zunächst ergaben sich Schwierigkeiten bei der Wahl der Konzentrationen, die schließlich für Thrombin bei 4 E/cm und für Fibrinogen bei 1,5%iger Lösung als optimal hinsichtlich des Tempos und Ausmaßes

der Gerinnung befunden wurden. Die $m\epsilon$ - Ausschläge waren besonders empfindlich für die Erhöhung oder Erniedrigung der Fibrinogen - Konzentration. I In 1%iger Lösung blieben die Ausschläge sehr schmal, während sie bei 2 % so breit gefunden wurden, daß sie auf Zusatz von zu testenden Seren überhaupt nicht reagierten. Auffällig war die Differenz zwischen den einzelnen Testansätzen, die trotz der stets gleichen Herstellung der Lösungen oft recht bedeutend war und deren Ursache noch nicht geklärt werden konnte.

Ausführung:

0,17 ccm der 1,5%igen Fibrinogenlösung wurden in die Küvette gebracht, dazu 0,034 ccm NaCl. Erst nach Einsetzen der Küvette in den Apparat wurden 0,17 ccm Thrombinlösung hinzugegeben und der Stempel zur besseren Durchmischung auf- und niedergeschraubt. Mischt man nämlich Fibrinogen und Thrombin vor dem Zusatz des Serums, so gerinnt die Mischung schon, ehe der Apparat noch mit der Registrierung begonnen hat.

a) Untersuchungen über $m\epsilon$ -Veränderungen unter Einfluß verschiedener Temperaturen auf Fibrinogen - und Thrombinlösung unter Berücksichtigung der Alterung derselben.

Ansatz 1: 1,5%iges Fibrinogen
4 E Thrombin /ccm
1 /10 Vol. NaCl

Zeit	Zimmertemperatur	37°	0°
frisch	$m\epsilon = 18$	$m\epsilon = 16$	$m\epsilon = 22$
1 Std.	12	18	12
2 "	15	15	16
3 "	13	13	11
4 "	13	16	27
5 "	13	15	24
	größte Differenz = 6 (33%)	größte Differenz = 5 (28%)	größte Differenz = 16 (61%)

Ansatz 2: wie oben

Zeit	m ξ (Zimmertemperatur)
frisch	39
1 Std.	35
2 Std.	33
3 Std.	31
4 Std.	32
5 Std.	35
2 Tage	39

Diskussion:

Bei Verwendung des Reinsystems zeigte es sich, daß in den von uns geprüften Zeitabständen die Alterung der Lösungen einen nur mäßigen, nicht gesetzmäßigen Einfluß auf den Ausfall der m ξ -Werte hatte.

Der Einfluß der Temperatur wurde insofern untersucht, als die Lösungen für das Reinsystem das eine Mal bei Zimmertemperatur, das andere Mal bei 37°, ein drittes Mal bei 0° aufbewahrt wurden. Es ergaben sich keine gesetzmäßigen Änderungen der Meßwerte. Die Schwankungen von m ξ in den Ergebnissen waren bei den bei 0° aufbewahrten Lösungen am stärksten.

b) Untersuchungen über die Zweckmäßigkeit der Konservierung von reinem Thrombin mit Antistin.

Da es nach Ergebnissen von MARX sicher ist, daß Antistin die Thrombin-konservierung verbessert, schien es zweckmäßig, gerade im Hinblick auf die Versuche am Reinsystem, Antistin-Thrombin im Vergleich zu reiner Thrombinlösung zu prüfen.

Ansatz:

1,5%iges Fibrinogen, 4 E Thrombin /ccm $\pm$ 1/10 Vol. Antistin bzw. 1/10 Vol. NaCl.

Zeit	Fibr. + Reinhrombin	Fibr. + Antistinhrombin
frisch	m ξ = 39	m ξ = 22
1 Std.	35	20
2 Std.	33	20
3 Std.	31	21
4 Std.	32	20
5 Std.	35	20
2 Tage	29	21

Diskussion:

Verwendeten wir statt reiner Thrombinlösung eine Kombination von Antistin und Thrombin, so bekamen wir niedrigere, aber konstantere Werte von m ξ bei Alterung.

c) Bedeutung des Serumeigenthrombins für die Fibrinogen - Thrombin - Reinsystem - Untersuchungen:

In einer eigenen Versuchsanordnung sollte geprüft werden, ob Normalserum durch seinen Gehalt an Eigenthrombin im Testsystem bedeutsame Aktivität entfalten kann. Dabei wurden 0,2 ccm Fibrinogen mit 0,2 ccm Normalserum ohne weiteren Zusatz von Thrombin in der Küvette gemischt. Dann ergab sich im TEG ein äußerst geringer Ausschlag: der m ξ -Wert betrug 2.

Es ist also nicht zu erwarten, daß der Eigenthrombinwert des Serums im Testansatz den Ausfall von m ξ im Thrombelastogramm beeinflusst.

2) Untersuchungen über eine Veränderung des Serums bei der Alterung .

Bei Verwendung alten, im Eisschrank aufbewahrten Serums im TEG wurde häufig eine gewisse Veränderung der Gerinnungsgrößen festgestellt, die möglicherweise vom Zeitpunkt der Blutentnahme abhängt. Um den Einfluß der Alterung auf das Serum anhand von m ξ zu beobachten, wurden mehrere Untersuchungen am Reinsystem Fibrinogen - Thrombin durchgeführt.

Die Ausführung

erfolgte in der oben beschriebenen Weise, nur daß zur Fibrinogenlösung statt

0,034 NaCl die gleiche Menge Serum zugefügt wurde. Außerdem wurde bei jedem Ansatz ein Leerwert unter Zusatz von NaCl bestimmt. Die Ergebnisse können nur in Abhängigkeit von dem jeweiligen Leerwert bewertet werden. Da dieser aber in den einzelnen Ansätzen unterschiedlich ausfällt, ist es nötig, ein Bezugssystem zu schaffen. Es sei daher der jeweilige Leerwert als 100 % angenommen.

Ansatz 1: 1,5%iges Fibrinogen
4 E Thrombin /ccm
1/10 Vol. NaCl bzw. Serum

Leerwert: $m \xi = 72$ (100 %)

Zeit	Serum 1		Serum 2		Serum 3	
	m ξ	%	m ξ	%	m ξ	%
1 Std.	108	150	110	153	100	139
2 Std.	127	162	100	139	100	139
3 Std.	104	144	104	144	92	128
4 Std.	104	144	104	144	94	130
5 Std.	100	139	100	139	92	128
24 Std.	85	118	89	123	100	139

Ansatz 2: 1,5%iges Fibrinogen
4 E Thrombin/ccm
1/10 Vol. NaCl bzw. Serum

Zeit	m ξ	%
Leerwert	52	100
frisches Serum	127	244
1 Tag alt	64	123

Ansatz 3: wie oben

Zeit	m ξ	%
Leerwert	39	100
frisches Serum	96	245
5 Std. alt	100	256
2 Tage alt	64	164

Ansatz 4: wie oben

Zeit	m ξ	%
Leerwert	39	160
frisches Serum	96	246
1 Std. alt	100	256
2 Std. alt	84	215
3 Std. alt	104	266
4 Std. alt	96	245
5 Std. alt	100	256
2 Tage alt	64	164

Diskussion:

Die Hinzufügung von Serum zum Reinsystem Fibrinogen-Thrombin führte zu einer wesentlichen, wenn auch in ihren Ausmaßen nach Serumindividualität unterschiedlichen Erhöhung von m ξ .

Die Alterung der Seren vor Hinzufügung zum Reinsystem brachte gewisse Veränderungen von m ξ mit sich, die zwar für die ersten 5 Stunden keine Gesetzmäßigkeiten erkennen ließen, dann aber auf eine Verminderung des ursprünglichen Einflusses frischen Serums schließen ließen (siehe Werte nach 1 und 2 Tagen).

3) Zum Problem einer pathologischen Alteration der m ξ - Cofaktor - Aktivität in Sera:

Nachdem wir bei den Untersuchungen am Reinsystem durch Hinzufügung von Sera eine nach Serumindividualität verschieden ausfallende m ξ - Erhöhung gefunden hatten, schien uns die Frage interessant, ob nicht bei pathologischen Sera die Serum-Cofaktor - Aktivität in bestimmter, evtl. sogar krankheitsspezifischer Weise verändert sei.

Um diese Frage zu klären, gingen wir folgendermaßen vor: Wir bestimmten das TEG für das oben beschriebene Reinsystem und dann das TEG einer Mischung dieses Reinsystems mit Seren gesunder und kranker Personen. Der Leerwert des Reinsystems eines jeden Ansatzes wurde als gleichlautend mit 100 % angenommen. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen,

daß die TEG - m ϵ -Werte eines und desselben Serums bei Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen oft erhebliche und von uns zunächst nicht erklär-bare Schwankungen aufwiesen. Die hier verwendeten Sera waren nie älter als 1 Tag.

Die Ausführung

der Versuche geschah in der früher beschriebenen Weise: 1,7 ccm Fibrinogen-lösung und 0,034 ccm des zu testenden Serums wurden in die Küvette ge-füllt und 1,7 ccm Thrombinlösung dazu gemischt. Es wurden hauptsächlich die Seren von Leberkranken und Patienten, die an Störungen der Blutgerin-nung litten, untersucht, und Normalseren gegenübergestellt.

Ansatz 1: 1,5%iges Fibrinogen
4 E Thrombin /ccm
1/10 Vol. Serum bzw. NaCl

Es sind nur die in diesem Zusammenhang besonders interessierenden m ϵ - Werte aufgeführt, dazu die %-Zahlen, bezogen auf den Leerwert.

	m ϵ	%	% erhöht
Leerwert	28	100	
Normalserum	85	303	203
Hämorrhag. Diathese ungeklärter Ursache	75	267	167
Hämolyt. Ikterus	79	282	182
Anämia perniciosa	108	385	285
Hämophilie A	72	257	157
Hämorrh. Diathese (Faktor IX/X-Mangel infolge Hepatopathie)	75	267	167
Hämophilie B	80	286	186
Thrombopenie 65000 Thz.	85	303	203

Ansatz 2: 1,5%iges Fibrinogen
4 E Thrombin /ccm
1/10 Vol. Serum bzw. NaCl

	m £	%	% erhöht
Leerwert	35	100	
Normalserum	79	239	139
Hepatitis epidemica	64	193	93
Lebercirrhose	82	245	145
M. Hodgkin	82	245	145

Ansatz 3: wie oben

	m £	%	% erhöht
Leerwert	66	100	
Normalserum	90	136	36
Hämophilie A	82	124	24
Hämophilie B	75	113	13

Ansatz 4: wie oben

	m £	%	% erhöht
Leerwert	18	100	
Normalserum	36	200	100
Thrombose	29	161	61
Hämorrhag. Diathese ungeklärter Ursache	35	194	94
Hepatitis epidemica	37	205	105

Ansatz 5: wie oben

	m £	%	% erhöht
Leerwert	21	100	
Normalserum	62	295	195
Biliäre Lebercirrhose	56	266	166
Hepatitis epidemica	56	266	166
Hämophilie A	49	233	133

Ansatz 6: wie oben

	m £	%	% erhöht
Leerwert	32	100	
Normalserum	97	306	206
Hämorrhag. Diathese (Faktor VII u. IX-Mangel)	82	256	156
Polycytämia vera nach Splenektomie	79	247	147
Anämie.	85	265	165
Hämorrhag. Diathese ungeklärter Ursache	100	312	212

Ansatz 7: wie oben

	m $\mathcal{E}$	%	% erhöht
Leerwert	7	100	
Normalserum	11	167	67
Thrombopenie Thz. 40000	8	114	14

Ansatz 8: wie oben

	m $\mathcal{E}$	%	% erhöht
Leerwert	52	100	
Normalserum	122	234	134
Thrombopenie Thz. 60000	104	200	100
Chron. myel. Leukämie	108	207	107
Hämophilie A	144	277	177
Thrombopenie Thz. 31000	138	265	165
Hämorrhag. Diathese ungeklärter Ursache	89	171	71
Hepatitis epidemica	69	132	32

Ansatz 9: wie oben

	m $\mathcal{E}$	%	+ erhöht
Leerwert	14	100	
Normalserum	37	264	164
Lebercirrhose Herzinsuffizienz	30	214	114

Diskussion:

Hier seien kurz noch einmal die Werte der einzelnen pathologischen Sera (in %) und die dazu gehörigen Normalwerte des gleichen Ansatzes aufgeführt, um eine bessere Übersicht zu erreichen und die Mittelwerte zu gewinnen.

Die normale Erhöhung von m $\mathcal{E}$ beträgt im Mittel 138 %.

Thrombopenien:

Normal	Pathologisch
203	203
134	100
134	165
<u>67</u>	<u>14</u>
538 : 4	482 : 4
<u>= 134 %</u>	<u>= 120 %</u>

Hepatitis und Cirrhose:

Normal	Pathologisch
134	32
164	114
100	105
195	166
195	166
203	182
139	93
<u>139</u>	<u>145</u>
1269 : 8	1103 : 8
<u>= 158 ‰</u>	<u>= 125 ‰</u>

Anämia perniciosa:

Normal	Pathologisch
203 ‰	285 ‰

Myeloische Leukämie:

Normal	Pathologisch
134 ‰	107 ‰

M. Hodgkin:

Normal	Pathologisch
139 ‰	145 ‰

Polycytämia vera:

Normal	Pathologisch
206 ‰	147 ‰

Hämorrhag. Diathesen:

Normal	Pathologisch
203	167
203	167
100	94
206	156
206	165
206	212
<u>134</u>	<u>71</u>
1258 : 7 = <u>180 ‰</u>	1032 : 7 = <u>147 ‰</u>

Hämophilien:

Normal	Pathologisch
203	157
203	186
36	24
36	13
195	133
<u>134</u>	<u>177</u>
807 : 6	694 : 6
<u>= 134 %</u>	<u>= 115 %</u>

Thrombose:

Normal	Pathologisch
100 %	61 %

Zusammenfassung:

Aus den errechneten Mittelwerten ist zu ersehen, daß normales Serum m $\mathcal{E}$ im Reinsystem stark erhöht und daß manche pathologischen Sera nicht in demselben Ausmaß wie Sera gesunder Personen wirksam sind. Doch scheint ihnen nach den vorliegenden Versuchen eine krankheits-spezifische Wirkung nicht eigen zu sein. Die auffallend großen Differenzen in den einzelnen Testansätzen, deren Ursache zunächst nicht geklärt werden konnte, machen weitere Untersuchungen mit methodischen Verbesserungen notwendig. Vielleicht variierten in den einzelnen Ansätzen trotz sorgfältiger Ausführung die Konzentrationen der m $\mathcal{E}$ - bedingenden Faktoren. Besonders müßte künftig der exakte Zeitabstand der Serumanalyse nach der Gerinnung sowie die Art der Kontakt-Serumaktivierung berücksichtigt werden.

Über eine charakteristische Veränderung des Serum-Cofaktors unter bestimmten Krankheitsbedingungen, die als solche im TEG als m $\mathcal{E}$ - Depression sichtbar würde, läßt sich daher zunächst nichts Sicheres aussagen.

B) Voruntersuchungen zum Thema des Nachweises von Thrombozyten - Antikörpern und Auto- Antikörpern mit Hilfe der Konstante $m \mathcal{E}$ im TEG:

In der Klinik taucht immer wieder die Frage auf, ob Transfusionen gruppengleichen Blutes die Thromboseneigung erhöhen oder erniedrigen. Beide Möglichkeiten waren zu diskutieren, da angenommen werden konnte, daß bei der Transfusion die zugeführten Thrombozyten rasch aufgelöst würden, (Vorhandensein spezifischer Antikörper im Empfängerblut) und daß dadurch Thrombozytenfaktor 3 frei und die Gerinnungsfähigkeit erhöht würde, andererseits aber auch, daß durch Bildung einer Antigen-Antikörper-Reaktion und Auflagerung dieser Komplexe auf Thrombozyten eine Thrombopenie und eine Verzögerung der Gerinnung, damit aber eine Erhöhung der Blutungsneigung resultierte. Insbesondere interessierte dazu auch, ob die Gegenwart von Thrombozyten-Autoantikörpern, die bei Thrombopenien vorkommen können, durch Mischungen von Thrombopenieblut mit Normalblut thrombelastographisch im $m \mathcal{E}$ - Wert erkannt werden könnte; denn es wäre doch wohl denkbar, daß durch Aufladung der normalen Thrombozyten mit den fraglichen Autoantikörpern bzw. sonstigen thrombozytenschädigenden Agentien im Thrombopenieblut die Thrombozyten einer Mischung von Normalblut und Thrombopenieblut so verändert werden können, daß ihre Wirkung auf den $m \mathcal{E}$ - Wert geringer ausfällt.

Dementsprechend war zu prüfen:

- 1.) Die Mischung von gruppengleichen gesunden Zitratblutproben (a) und -Plasmen (b), und, ergänzend, von gruppengleichem Blut (c).
- 2.) Die Mischung von gruppengleichem Thrombopenieblut mit gesundem Blut.

Ausführung:

Durch Entnahme von etwas Frischblut aus der Fingerbeere oder dem Ohr läppchen wurden Blutgruppe und Rh-Faktor der gesunden bzw. thrombopeniekranken Versuchspersonen bestimmt. Zuweilen wurde die Gruppenbestimmung auch an Zitratblut ausgeführt. Thrombelastographisch erfolgte dann die Feststellung des jeweiligen Leerwertes und des Mischungswertes. Die Mischung wurde immer zu gleichen Teilen vorgenommen. Blut und Plasma mußten bald nach der Entnahme untersucht werden, um Alterungseinflüsse auszuschließen. Außerdem wurden stets der Hämatokritwert und die Thrombozytenzahl kontrolliert. Die Mischung der beiden verschiedenen Blute wurde so durchgeführt, daß sie nacheinander in

die Cuvette gefüllt, und dann sofort rekalkifiziert und durch mehrmaliges Heben und Senken des Stempels gemischt wurden.

1) m $\mathcal{E}$ bei Mischungen gesunden Blutes:

In den folgenden Tabellen werden unter m $\mathcal{E}$ 1 und m $\mathcal{E}$ 2 die TEG-Meßergebnisse von Menschen mit gleicher Blutgruppe angegeben. Unter m $\mathcal{E}$ (Mischung) sind die Meßergebnisse der Mischung von Zitratblut der ersten und zweiten Gruppe von Versuchspersonen angeführt. In einer vierten Spalte sind die Mittelwerte aus m $\mathcal{E}$ 1 und m $\mathcal{E}$ 2 genannt, um einen Vergleich zu dem Mischungswert zu geben.

a) Mischungen gruppengleicher Zitratblutproben:

m $\mathcal{E}$ 1	m $\mathcal{E}$ 2	m $\mathcal{E}$ (Mischung)	m $\mathcal{E}$ Mittelwert
108	127	56	117
89	108	72	98
127	189	64	108
133	70	138	104
80	215	135	148
117	104	89	110
117	96	55	106
96	104	73	100
108	122	92	115
108	150	140	129
122	150	82	136
78	109	96	92
92	100	80	96

b) Mischungen gruppengleicher Zitratplasmen:

m ξ 1	m ξ 2	m ξ (Mischung)	m ξ (Mittelwert)
195	195	100	195
190	190	190	190
195	195	186	195
170	194	113	182
117	122	117	119
212	118	153	165
85	100	113	92
165	102	92	133
96	150	133	123
135	82	138	108
135	165	96	150
165	150	100	157
85	85	104	85
123	85	100	104
123	85	104	104

c) Mischungen gruppenverschiedener Zitratblutproben:

	m ξ 1	m ξ 2	m ξ (Mischung)	m ξ (Mittelwert)
O/A ₁	100	212	90	156
O/B ₁	61	89	89	75
A ₁ /B	104	195	69	150
A ₁ /B ₁	100	89	69	96

Diskussion der Ergebnisse:

Als signifikante Unterschiede mögen nur diejenigen Zahlen gewertet werden, die mehr als ± 10 vom Mittelwert abweichen. Dann ergeben sich von 13 untersuchten Mischungen von gruppengleichem Zitratblut 10 unter, 2 über dem Mittelwert, 1 mal decken sich die Werte ungefähr. Bei den 15 untersuchten gruppengleichen Zitratplasmen lag der m ξ -Wert bei 7 von ihnen unter, bei 4 über dem Mittelwert.

In 4 Fällen deckte er sich ungefähr mit ihm (± 10). Bei den Mischungen gruppengleichen Blutes wurden nur 4 Fälle untersucht; bei 3 von ihnen lag der Mischungswert unter dem errechenbaren Mittelwert, bei 1 darüber.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Erhöhung bzw. Erniedrigung von $m \xi$ bei Mischungen gruppengleichen Blutes ziemlich wahllos zu erfolgen scheint. Für einen thrombusfestigenden Anreiz hierbei ergab sich kein Anhaltspunkt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von SOMMER, der eine Steigerung der elastischen Thrombusfestigkeit über den errechenbaren Mittelwert hinaus gefunden hatte. Eher scheint die Thrombusfestigkeit, für die $m \xi$ ja eine Meßgröße ist, abzunehmen, besonders bei Berücksichtigung der mit Zitratblut erhaltenen Ergebnisse. (Hier lagen bei 13 untersuchten Mischungen 10 Werte unter dem Mittelwert.) Auch fällt auf, daß sehr häufig bei den Versuchen an Zitratblut der Mischungswert sogar unter die untere Normgrenze von $m \xi$ (= 85) absank (sie wurde dabei in 7 von 13 Fällen unterschritten!). Möglicherweise könnte man in diesem Absinken von $m \xi$ unter den errechenbaren Mittelwert das sichtbare Zeichen des Ablaufs einer Antigen-Antikörper-Reaktion erblicken.

Über die anderen thrombelastographisch festlegbaren Gerinnungsgrößen, die Reaktionszeit und die Gerinnselbildungszeit läßt sich in diesem Zusammenhang sagen, daß eintretende Veränderungen hauptsächlich die Reaktionszeit betreffen, und zwar in verkürzendem Sinne. Sie war verkürzt in 9 von 13 Fällen der Untersuchungen an Zitratblut, und in 7 von 15 Fällen der Plasmauntersuchungen, während die Gerinnselbildungszeit kaum irgendwelchen Veränderungen unterlag.

Es sei darauf hingewiesen, daß die gewählte Versuchsanordnung möglicherweise noch nicht die optimale Durchmischung der entsprechenden Blutproben garantiert hat.

2) Thrombopenie-Blut im TEG:

In gleicher Ausführung wie die vorigen Versuche wurde Zitratblut von Thrombopenikern zu gleichen Teilen mit gruppengleichem Blut gesunder Menschen gemischt und thrombelastographisch untersucht. In der folgenden Tabelle ist hinter dem $m \xi$ -Wert bei Thrombopenie in Klammern die Zahl der Throm-

bozyten aufgeführt.

m ξ - normal	m ξ -Thrombopenie	m ξ -Mischung	Mittelwert
85	13 (4000)	58	49
90	54 (13000)	49	77
215	65 (60000)	130	140
122	19 (7000)	47	70
127	56 (120000)	82	90
108	56 (15000)	100	82
215	68	130	142

Diskussion:

Von 7 untersuchten Mischungen liegt der Mischungswert bei 5 Fällen unter, bei 2 Fällen über dem Mittelwert. 2 der Fälle waren auch nur leichte Thrombopenien.

Eine m ξ -depressorische Wirkung des Thrombopenieblutes (Antikörper?) kann für möglich gehalten werden. Die sichere Deutung ist aber so lange nicht möglich, als es nicht gelungen ist, die thrombelastographischen Ergebnisse der Blutmischungen methodologisch besser zu normen. Die Schwierigkeiten der bisher angewendeten Methode dürften vor allem darin zu suchen sein, daß mehrere Determinanten des m ξ -Wertes bei den Mischversuchen variieren. Es dürfte daher zweckmäßig sein, bei künftigen Experimenten die Versuchsanordnung andersartig zu gestalten, indem man gruppengleiche Thrombozyten aus Normalplasma einmal in Thrombopenieplasma, einmal in Normalplasma genormte Zeiten bei genormten Bedingungen suspendiert (und dann zurückgewinnt) und dann vergleichend in einem und demselben thrombozytenfreien Normalplasma einverleibt untersucht, ob die mit dem Thrombopenieplasma inkubierten Thrombozyten an Qualität verloren haben. Bei dieser Versuchsanordnung könnten die anderen variierenden Faktoren, welche den m ξ -Wert mitbestimmen, gleich gehalten werden (Fibrinogen, Serumfaktoren)(MARX).

C) Wirkung von klinisch verwendeten Antithrombotika auf die Komponente m ξ im TEG:

1.) Die Auswirkung von Heparinen und Heparinoiden auf m ξ bei Zusatz zu Zitratplasma:

Die alpha - Heparin - Präparate

1. Fa. Novo,
2. "Heparin - Na," - ein Versuchspräparat des Labors Dr. R. MARX,
3. Liquemin, ferner
4. das heparinähnliche Präparat Eleparon,
5. die Heparinoide Thrombocid, Heparinoid Geigy und das Mikroheparinoid SP 54 (Dr. Benend, München-Solln).

In der Therapie und Prophylaxe von Thrombo - Embolien haben die alpha - Heparine schon lange ihren festen Platz. Da die Gewinnung dieser Gewebs-extrakte aus verschiedenen Tierorganen mit hohen Fabrikationskosten verbunden ist, sind die Präparate relativ teuer. Es wurden auch immer wieder vereinzelt Nebenwirkungen im Sinne allergischer Reaktionen beobachtet und von verschiedenen Autoren (JORGES, IZARN, PLANCHEREL, VODOPIVEC, BAUMGARTNER, BREDA und BIZZI) über Auftreten von Antikörpern im Serum nach Behandlung mit Nativ-Heparin berichtet. Daher wurden ständig Versuche unternommen, synthetische Präparate mit ähnlichen pharmakologischen und therapeutischen Effekten, sogenannte "Heparinoide" (R. MARX) zu entwickeln. Diese können wirtschaftlicher sein als die Heparine und entfalten, da sie keine Eiweißbeimengung enthalten, auch keine Antigenwirkung. Solche Präparate wurden von verschiedenen Firmen auf den Markt gebracht, während in der Literatur noch das Für und Wider ihrer Anwendbarkeit und Wirkung diskutiert wird.

Angeregt durch Publikationen von MARX, von HARTERT, HARDEGG und HIERONYMI wurden verschiedene Heparine und Heparinoide hinsichtlich ihrer gerinnungshemmenden Wirkung im TEG verglichen. Hieraus dürfen nicht ohne weiteres bindende Rückschlüsse auf ihre Wirkung auf das Blutgerinnungssystem unter anderen Testbedingungen oder die Wirkung in vivo gezogen werden. Im einzelnen handelt es sich um die Heparinoide: Heparinoid Geigy, Thrombocid, SP 54 (Dr. Benend KG) und den "Heparinkörper" Eleparon (Luitpoldwerke, München) im Vergleich zu den alpha-Heparinen: Heparin Novo, Heparin-Natrium und Liquemin.

Ausführung:

In mehreren Ansätzen wurden zu Zitratplasma ohne und mit Inkubationszeit die verdünnten Testsubstanzen zugegeben und dann rekalfiziert. Hierbei waren die Verdünnungen so gewählt, daß möglichst von jedem geprüften Präparat die Konzentrationen erfaßt wurden, bei denen die Gerinnung völlig gehemmt war, dann die Schwelle des Wiedereinsetzens und des normalen Verlaufs der Gerinnung.

Bekanntlich beruht die gerinnungshemmende Wirkung des alpha-Heparins auf einer verzögerten Bildung von Thrombin aus Prothrombin und auf einer Aufhebung der Wirkung des Thrombins auf das Fibrinogen. Interessant schien daher auch die Frage, ob die Wirkung der Testsubstanz auch die Thrombozytenfunktion betrifft, oder nur an den Serumfaktoren angreift. Um den Einfluß der Testsubstanz auf den Fibrinaufbau einerseits und auf die Thrombozytenfunktion andererseits zu studieren, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Thrombozyten - Suspension und thrombozytenfreies Plasma getrennt voneinander zur Testlösung zugesetzt und thrombelastographisch untersucht. In den Ansätzen wurden jeweils 0,25 ml Zitratplasma und 0,05 ml der verschiedenen verdünnten Testsubstanz gemischt und mit 0,06 ml 1,29%iger CaCl_2 -Lösung rekalfiziert. Die Thrombozyten-Suspension wurde folgendermaßen gewonnen: Nach leichtem Abzentrifugieren von Zitratplasma wurde das noch thrombozytenhaltige Plasma abpipettiert und durch starkes Zentrifugieren und Abgießen der Flüssigkeit die Thrombozyten als Bodensatz gewonnen. Sie wurden mehrere Male gewaschen in einer Lösung, die NaCl - und Na - Zitratlösung im Verhältnis 9 : 1 enthält, dann gezählt, abzentrifugiert und der Bodensatz in Aqua dest. aufgenommen.

1) Zitratplasma und Testsubstanz:

Ansatz 1): Vergleich von alpha-Heparin Novo, Eleparon und Thrombocid.

Ohne Inkubation

0,25 ml Zitratplasma,
0,05 ml Testsubstanz,
0,06 ml CaCl_2 -Lösung.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		10	2	15	66	194
Heparin Novo	1 : 10	keine Gerinnung				
"	1 : 200	" "				
"	1 : 1000	verzögert einsetzende Gerinnung				
		37		23	18	22
Eleparon	1 : 1000	keine Gerinnung				
"	1 : 2000	spät einsetzende Gerinnung				
		45	18	45	42	72
Thrombocid	1 : 50	keine Gerinnung				
"	1 : 200	12	5	26	64	178

Ohne Inkubation setzt eine wenn auch verzögerte Gerinnung ein bei:

Heparin Novo	in der Verdünnung	1 : 1000
Eleparon	" " "	1 : 2000
Thrombocid	" " "	1 : 200

Ansatz 2): wie oben, Inkubationszeit 6 Min.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		4	3	18	33	49
Heparin Novo	1 : 2000	keine Gerinnung				
" "	1 : 4000	" "				

Eleparon: Verdünnung 1 : 2000 : keine Gerinnung
 Thrombocid: " 1 : 50 : keine Gerinnung

Mit Inkubationszeit (6 Minuten) scheint sich die Gerinnungshemmung zu verstärken, d.h. um eine Gerinnung hervorzurufen, ist eine stärkere Verdünnung notwendig.

Ansatz 3): wie oben, 10 Minuten Inkubationszeit

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ϵ
Kontrolle NaCl		11	5	11	36	56
Heparin Novo	1 : 4000	10	7	10	32	47
Eleparon	1 : 2000	7	5	24	50	100
Thrombocid	1 : 50	keine Gerinnung				

Ansatz 4): wie oben, Inkubationszeit 10 Minuten

Vergleich von Liquemin, Thrombocid und SP 54 (Dr. Benend KG)

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ϵ
Kontrolle NaCl		9	2,5	27	60	150
Liquemin	1 : 5000	keine Gerinnung				
"	1 : 8000	17	6,5	28	54	117
Thrombocid	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 400	20	8	45	46	85
"	1 : 500	27	12	48	56	127
SP 54	1 : 100	keine Gerinnung				
"	1 : 200	"	"	"	"	"
"	1 : 300	"	"	"	"	"
"	1 : 400	16	5	28	52	109
"	1 : 500	12	5	29	53	113
"	1 : 1000	10	4	27	58	138

Ansatz 5): Vergleich von Heparin - Natrium, Liquemin, Eleparon, Heparinoid Geigy, Thrombocid.

Inkubationszeit 10 Minuten.

0,25 ml Zitratplasma

0,05 ml Testsubstanzverdünnung

0,06 ml CaCl₂

Endkonzentration der Testsubstanzen 7,2-fach geringer als in der angegebenen Verdünnung.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		7	3	9	42	72
Heparin Na	1 : 1000	keine Gerinnung nach 2 Std.				
"	1 : 2000	"	"	"	"	"
"	1 : 4000	65	48	110	33	49
"	1 : 5000	68	50	80	50	100
"	1 : 8000	50	28	60	43	75
"	1 : 10000	35	16	26	37	59
Liquemin	1 : 4000	keine Gerinnung				
"	1 : 5000	"	"			
"	1 : 8000	verzögerte Gerinnung				
		75		40	13	15
"	1 : 10000	9	17	80	54	117
Eleparon	1 : 500	Gerinnung nach 200 Min.				
					22	28
"	1 : 1000	40	20	50	38	61
"	1 : 2000	28	10	23	34	52
Heparinoid Geigy	1 : 250	keine Gerinnung				
"	1 : 500	50	17		16	19
Thrombocid	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 300	"	"			
"	1 : 500	35	50	70	60	150

II) Thrombozytenfreies Plasma und Testsubstanz:

Ansatz 1): 0,18 ml thrombozytenfreies Plasma wurde mit
0,05 ml Testsubstanz 10 Minuten inkubiert.
0,07 ml Thrombozytensuspension wurde jeweils bei der Rekalzifi-
zierung zugegeben.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		2	12	32	24	32
Heparin Novo	1 : 2000	keine Gerinnung				
" "	1 : 2000	"	"			

Eleparon	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 200	" "				
"	1 : 1000	5,5	65	17	20	
Thrombocid	1 : 20	keine Gerinnung				
"	1 : 20	" "				
"	1 : 50	" "				
"	1 : 200	verzögert einsetzende Gerinnung				
		30	23	11	12	

Ansatz 2): wie oben. Vergleich von Liquemin, Thrombocid, SP 54.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		4	7	30	34	52
Liquemin	1 : 5000	keine Gerinnung				
"	1 : 8000	4	7	22	21	27
Thrombocid	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 400	40	36	75	40	67
"	1 : 500	14	17	40	26	35
SP 54	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 400	25	50	75	40	67
"	1 : 500	6,5	5,5	28	32	54

Ansatz 3): Vergleich von Heparin - Natrium, Liquemin, Eleparon, Heparin Geigy und Thrombocid.

0,18 ml thrombozytenfreies Plasma

0,05 ml Testsubstanz

0,07 ml Thrombozyten - Suspension

10 Minuten Inkubationszeit.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		2	3,5	24	41	69
Heparin-Na	1 : 5000	12	19	48	24	33
"	1 : 5000	11	21	65	30	43
"	1 : 8000	4,5	5	26	38	61

Ansatz 3) Fortsetzung:

	Verdünnung	x	k ₁	k ₂	a	m €
Liquemin	1 : 2000	29	43	60	24	32
"	1 : 5000	6,5	7	28	32	47
"	1 : 10000	2,5	4	25	36	56
Eleparon	1 : 500	17	45	60	28	39
"	1 : 1000	7,5	5,5	33	34	52
"	1 : 2000	3	3	20	41	69
Heparinoid Geigy	1 : 250	keine Gerinnung, erst nach 3 Std. Beginn:				
"	"				26	35
"	1 : 500	45		35	12	13
"	1 : 1000	17	65	75	35	54
Thrombocid	1 : 200	keine Gerinnung				
	1 : 500	8,5	6	28	36	58

III) Thrombozytensuspension und Testsubstanz:

Ansatz 1): 0,03 ml Thrombozytensuspension wurde mit
 0,05 ml Testsubstanz 10 Min. inkubiert.
 0,22 ml thrombozytenfreies Plasma wurden bei der Rekalzifizierung mit 0,06 ml CaCl₂ - Lösung zugesetzt. Die Endkonzentration der Testsubstanzen ist 7,2-fach geringer als in der angegebenen Verdünnungslösung.

Testsubstanzen: Heparin - Natrium, Liquemin, Eleparon, Heparinoid Geigy, Thrombocid.

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m €
Kontrolle NaCl		6	18	27	24	32
Heparin Na	1 : 2000	55		160	16	19
"	1 : 5000	12	44	65	31	45

Ansatz 1) Fortsetzung:

	Verdünnung	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Liquemin	1 : 2000	65		110	11	12
"	1 : 5000	9	10	30	28	39
Eleparon	1 : 1000	11	65	95	28	39
"	1 : 500	40		98	13	15
Heparinoid Geigy	1 : 500	keine Gerinnung				
"	1 : 1000	20		105	21	27
Thrombocid	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 500	10		25	18	22

Ansatz 2): 0,03 ml Thrombozyten - Suspension

0,05 Testsubstanz

0,22 ml thrombozytenfreies Plasma

10 Min. Inkubationszeit

Testsubstanzen: Heparin Novo, Liquemin, Eleparon, Thrombocid, SP 54
(Dr. Benend KG)

	<u>Verdünnung</u>	x	k ₁	k ₂	a	m ε
Kontrolle NaCl		7	39	65	26	36
Heparin Novo	1 : 500	keine Gerinnung				
"	1 : 500	"				
"	1 : 1000	äußerst schwache Gerinnung				
		50		280	4	4
Liquemin	1 : 5000	keine Gerinnung				
"	1 : 8000	10	37	60	29	39
Eleparon	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 500	"				
"	1 : 500	"				
"	1 : 800	14		80	19	23
"	1 : 1000	11	70	200	22	28

Ansatz 2) Fortsetzung:

	Verdünnung	x	k ₁	k ₂	a	m ξ
Thrombocid	1 : 20	keine Gerinnung				
"	1 : 50	"	"			
"	1 : 200	"	"			
"	1 : 200	sehr spät einsetzende Gerinnung				
		65		180	9	10
"	1 : 400	8	19	75	50	100
SP 54	1 : 200	keine Gerinnung				
"	1 : 400	8	19	75	55	122

Besprechung der Ergebnisse:

Zu D): Zitratplasma:

Im Vergleich der Konzentrationen, bei denen eben wieder verzögerte Gerinnung auftritt und bei denen sie gut ausgebildet ist, ergeben sich die Werte bei 10 Minuten Inkubationszeit für:

Liquemin	1 : 8000 (gut: 1 : 10 000)
Heparin-Na	1 : 5000 (gut: 1 : 10 000)
Heparin Novo	1 : 4000
Eleparon	1 : 1000 (besser: 1 : 2 000)
Heparinoid Geigy	1 : 500
Thrombocid	1 : 400 (gut: 1 : 500)
SP 54	1 : 400

In Bezug auf die Wirkungsstärke liegen in diesem Test die Heparine Liquemin, Heparin-Natrium und Heparin-Novo an der Spitze mit einem Wert (für wieder voll einsetzende Gerinnung) von etwa 1 : 8000 bis 1 : 10000, dann folgt Eleparon (1 : 2000) mit 1/4 bis 1/5 der Heparinwirkung und ungefähr gleichwertig Thrombocid, Heparinoid Geigy und SP 54 (1 : 400 bzw. 1 : 500) = etwa 1/20 der Heparinwirkung. Die Befunde, die im Testsystem des TEG gewonnen wurden, decken sich, was das Verhältnis der Wirksamkeit von Liquemin, Eleparon und Thrombocid betrifft, in etwa mit den Ergebnissen von HARTERT und MARX.

Auch die Inkubationszeit ist von Wichtigkeit:

Verzögerte Gerinnung	ohne I.	6 Min. I.	10 Min. I.
bei Heparin Novo	1 : 1000	keine Ger. bei 1 : 4000	1 : 4000
Eleparon	1 : 2000	1 : 2000	1 : 2000
Thrombocid	1 : 200	1 : 200	1 : 400

Ohne und mit nur 6 Minuten Inkubationszeit lagen für Heparin Novo, Eleparon und Thrombocid die Schwellenkonzentrationen für die eben wieder einsetzende Gerinnung wesentlich höher als mit 10 Minuten Inkubationszeit.

Es scheint also das Endergebnis: die Hemmwirkung auf die Blutgerinnung, abhängig zu sein vom Produkt aus der Konzentration der Testsubstanz und der Einwirkungsdauer (neben anderen Faktoren).

Zu II):

Hier wurde zunächst thrombozytenfreies Plasma mit der Testsubstanz 10 Minuten inkubiert, dann Thrombozyten - Suspension zugegeben.

Gerinnung	keine	verzögert	gut
Heparin Novo	1 : 2000		
Heparin - Na		1 : 5000	1 : 8000
Liquemin		1 : 2000	1 : 5000
Eleparon		1 : 500	1 : 1000
Thrombocid		1 : 200	1 : 500
Heparinoid Geigy		1 : 500	1 : 1000
SP 54		1 : 400	1 : 500

In diesem Test sind vergleichbar in der Wirkung Heparin Novo und Heparin Na (1 : 5000), dann folgt, etwa halb so wirksam, Liquemin (1 : 2000), dann Eleparon und Heparinoid Geigy mit je 1 : 500 (1/10), SP 54 mit 1 : 400, Thrombocid 1 : 200 (1/25).

Unterschiede gegen I) finden sich bei Liquemin (hier 1/4 bis 1/2 der Wirkung auf Vollplasma) und Eleparon (die Hälfte). Dies ließe darauf schließen, daß beide Stoffe nicht nur die Plasmafaktoren, sondern wesentlich auch die Thrombozyten in ihrer gerinnungsfördernden Funktion beeinträchtigen.

In Ansatz III)

wurde der Einfluß der Testsubstanzen auf den Fibrinaufbau geprüft, indem Thrombozyten - Suspension zunächst 10 Minuten mit der verdünnten Lösung inkubiert und erst dann das thrombozytenfreie Plasma zugesetzt wurde. Dabei ergab sich:

Gerinnung	schwach	gut
für Heparin - Na	1 : 2000	1 : 5000
Heparin Novo	1 : 1000	
Liquemin	1 : 2000	1 : 5000
Eleparon	1 : 500	1 : 1000
Heparinoid Geigy	1 : 1000	
Thrombocid		1 : 400
SP 54		1 : 400

Wieder sind etwa wirkungsgleich Liquemin, Heparin-Na und Heparin Novo (1 : 5000), dann folgt Heparinoid Geigy (1 : 1000 = etwa die Hälfte der Heparinwirkung), Eleparon (1/4 bis 1/5) und Thrombocid und SP 54 (etwa 1/12).

Heparinoid Geigy bedarf in Ansatz III) nur der Hälfte der Konzentration gegenüber I) und II), um den gleichen Effekt zu erzielen: Es scheint, ähnlich wie Liquemin und Eleparon, auch mit an der Thrombozytenfunktion anzugreifen, was von MARX und KÖHL ja auch mit anderen Testen gezeigt wurde.

SP 54 und Thrombocid verhalten sich in allen Ansätzen etwa gleich. Es können keine Rückschlüsse auf eine besondere Fibrin - oder Thrombozytenwirkung gezogen werden. Mit einer Schwellenkonzentration von 1 : 400 sind sie am schwächsten hemmend wirksam, sie besitzen im TEG rund 1/12 bis 1/20 der Heparinwirkung.

Verzögerte Gerinnung	I	II	III
Liquemin	1 : 8000	1 : 2000	1 : 5000
Heparin Na	1 : 5000	1 : 5000	1 : 2000
Heparin Novo	1 : 5000	1 : 5000	1 : 1000
Eleparon	1 : 1000	1 : 500	1 : 500
Heparinoid Geigy	1 : 500	1 : 500	1 : 1000
Thrombocid	1 : 400	1 : 200	1 : 400
SP 54	1 : 400	1 : 400	1 : 400

Zusammenfassung:

Die alpha - Heparin - Präparate: Heparin Na, Heparin Novo und Liquemin haben im TEG eine hohe gerinnungshemmende Wirkung; Eleparon ist (in diesem Teste, nicht in anderen Testen) nur 1/4 bis 1/5 so wirksam. Thrombocid, Heparinoid Geigy und SP 54 (Dr. Benend KG) sind im TEG ungefähr gleichwertig: Sie besitzen nur etwa 1/20 der Heparinwirkung bei unseren Untersuchungen im TEG.

Heparin Novo und Heparin-Na scheinen auf die Ausbildung des Fibringerinnsels zu wirken, während Liquemin, Eleparon und Heparinoid Geigy offenbar auch die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen. SP 54 und Thrombocid entfalten vorwiegend gerinnungshemmende Wirkung ohne stärkere Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion und des Gerinnselaufbaues, soweit sich aus dem angewendeten Test schließen läßt (was nur sehr bedingt möglich erscheint).

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der alpha-Heparin-Präparate sind vielleicht zurückzuführen auf methodologische Schwierigkeiten - (Normung der verwendeten Thrombozytensuspensionen) - vielleicht sind aber auch in den Präparaten der verschiedenen Firmen Unterschiede im Gehalt an Heparin - Fraktionen vorhanden und ursächlich für diese Differenzen in den Ergebnissen verantwortlich zu machen.

Im Ganzen gesehen sind die Wirkungen der aufgeführten Synthetica im TEG erheblich niedriger als in anderen (in vitro) - Testen. Ob daraus Schlüsse auf die Wirkung in vivo gezogen werden können, läßt sich noch nicht vorher sagen, weil in vivo die Kontaktoberflächen anders beschaffen sind und weder als metall- noch als glasähnlich aufgefaßt werden können.

D) Wirkung von Thrombo - Holzinger auf die Blutgerinnung:

Aus Wiener Kliniken wurde wiederholt über günstige Ergebnisse bei Behandlung von Thrombo - Embolien mit dem Präparat "Thrombo - Holzinger" (Firma Holzinger, Wien) berichtet. Es handelt sich um eine organische Säure mit mehreren Carboxylgruppen, deren blutgerinnungshemmende Wirkung in vitro sehr wahrscheinlich auf ihrer Calcium - bindenden Eigenschaft beruht. Seine Vorzüge sollen in seiner Wirtschaftlichkeit, seiner Ungiftigkeit und der Entbehrlichkeit von Laboratoriumskontrolle bestehen.

In Tier- und in vitro - Versuchen wurde die gerinnungshemmende Hemmung von Thrombo - Holzinger überprüft.

1. Thrombosol in vitro:

Zu Zitratblut wurde die Substanz in wechselnder Verdünnung zugesetzt.

- 1) 0,25 ml Zitratblut + 0,05 ml NaCl
- 2) " " " + 0,05 Th. konz. = 2,28 mg / ml
- 3) " " " + 0,05 Th. - Verd= 1,71 mg / ml
- 4) " " " + 0,05 Th. - Verd= 1,52 mg / ml
- 5) " " " + 0,05 Th. - Verd= 1,14 mg / ml
- 6) " " " + 0,05 Th. - Verd= 0,38 mg / ml

	x	k ₁	k ₂	a	m €
1)	3	2,5	19	46	95
2)	keine Gerinnung				
3)	17	20	26	22	28
4)	9,5		17	16	19
5)	4,5	2,5	13	43	75
6)	2	2,5	18	43	75

Thrombo - Holzinger hemmt die Blutgerinnung völlig in einer Konzentration von 2,28 mg / ml. Sie ist sehr verzögert und die Thrombusfestigkeit minimal in Konzentrationen von 1,71 und 1,52 mg / ml, während in der Verdünnung auf die Hälfte der Stammlösung = 1,14 mg / ml sich der Gerinnungsablauf und die Thrombusfestigkeit wieder weitgehend normalisiert haben. Die Wirkungsstärke erwies sich bei unseren Versuchen als etwas geringer als

in den vitro - Versuchen von REINHARD und RIESS, die eine Gerinnungshemmung schon bei Konzentrationen von 1,5 mg /ml sahen und einen Beginn der Hemmwirkung bei Konzentrationen von 0,9 mg / ml.

2. In vivo - Versuche:

Kaninchen erhielten 0,5 bis 1,0 ccm Thrombosol i.v. Dann wurden in bestimmten Zeitabständen die m ξ -Werte sowie die Thrombinzeit und Prothrombinzeit bestimmt.

0,5 ccm	Pt	Th	a	m ξ
max. Ampl.				
Vor Injektion	10,2	19,0	78	365
3 Min. nach Inj.	10,0	19,2	82	440
30 " " "	10,2	19,4	78	365
1 1/2 Std. "	11,0	19,0	72	257
2 1/2 Std. "			79	377

3 weitere Kaninchen erhielten ebenfalls 0,5 ccm Thrombosol i.v.

	a	m ξ	a	m ξ	a	m ξ
Vor Injektion	90	900	56	127	81	426
3 Min. nach Inj.	56	127	73	270	87	670
30 " " "	94	1500	94	1600	91	1111
1 1/2 Std. "	90	900	94	1600	95	1900
2 1/2 Std. "	85	567	95	1900	90	900

3 Kaninchen erhielten 0,75 ccm Thrombo - Holzinger:

	a	m ξ	a	m ξ	a	m ξ
Vor Injektion	84	525	84	525	69	222
3 Min. nach Inj.	72	257	95	1900	54	119
30 " " "	70	233	94	1566	61	156
1 1/2 Std. "	69	222!	80	400!	54	119!
2 1/2 " "	95	1900	95	1900	56	130

3 weitere Kaninchen erhielten 1,0 ccm Thrombo - Holzinger:

	a	m ξ	a	m ξ	a	m ξ
Vor Injektion	90	900	95	1900	69	222
3 Min. nach Inj.	86	614	65	186	61	156
30 " " "	81	426	88	733	60	150
1 1/2 Std. "	95	1900	80	400	64	178
2 1/2 " "	81	426	92	1200	62	163

Bei keinem der Tiere wurden irgendwelche tetanischen Anzeichen beobachtet,

Diskussion:

Die Ergebnisse zeigen ein äußerst verschiedenartiges Bild. Für die Anwendung beim Menschen ist eine Tagesdosis von 4-9 Ampullen Thrombosol bei schweren Fällen empfohlen - das sind 0,4 - 0,9 g täglich. Pro Kaninchen (3 kg) wurden 0,025 g - 0,030 g (in 0,5 bzw. 1,0 ccm) gegeben (das sind rund 1/20 - 1/10 der beim Menschen verwendeten Dosis). Diese Dosis dürfte etwa der beim Menschen vorgeschlagenen Therapiedosis entsprechen.

Bei der Gabe von 0,5 ccm Thrombosol veränderte sich m ξ nur unwesentlich: in einem Fall war es nach 1 1/2 Stunden, in einem anderen nach 3 Minuten schon abgesunken, in 2 weiteren Fällen hingegen verstärkte sich eher die Thrombusfestigkeit.

Bei Injektion von 0,75 ccm war dreimal m ξ nach 1 1/2 Std. gegenüber dem Ausgangswert gemindert, hatte sich aber nach einer weiteren Stunde wieder normalisiert.

Bei Gabe von 1,0 ccm Thrombosol ist am deutlichsten eine Verringerung von m ξ nach 3 - 30 Minuten zu beobachten, die nach 2 1/2 Stunden noch nicht ganz zum Ausgangswert zurückgekehrt ist.

Thrombinzeit und Prothrombinzeit veränderten sich nicht nennenswert.

Kontrolle beim Menschen:

Eine Patientin, die an Beinvenenthrombose litt, erhielt nach Bestimmung

des Leerwertes 2 ccm = 0,1 g Thrombo - Holzinger i.v. Dann wurden in zeitlichen Abständen von 1, 3 und 6 Stunden die Blutwerte kontrolliert.

	r	k ₁	k ₂	a	m ξ
Zitratblut leer	5	4	27	55	125
5 Min. nach Inj.	6,5	6,5	28	45	82
1 Std. " "	8	3	17	54	117
3 " " "	5,5	4	26	56	127
6 " " "	8	3	18	54	117

Die Thrombusfestigkeit nahm nach der Injektion um einen sehr geringen Betrag ab, ebenso die Gerinnungszeit, nicht aber die Gerinselformierungszeit. Die Ergebnisse sind nicht so signifikant, daß sich bindende Rückschlüsse daraus ziehen ließen.

Zusammenfassung:

In vitro zeigt sich völlige Hemmung der Blutgerinnung bei einer Konzentration von 2,28 mg / ml Thrombosol, in der Konzentration 1,14 mg / ml ist die Gerinnung normal, zwischen diesen beiden Werten verzögert. Beim Kaninchen zeigte sich vorübergehendes Absinken von m ξ nach i.v.-Injektion von Thrombosol in genügender Dosierung.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bestimmbarkeit der m ξ -Cofaktor-Aktivität von pathologischen Seren wurde näher untersucht.

Es zeigte sich eine Minderung der m ξ -Cofaktor-Aktivität alternden Serums.

Bei der verwendeten Art der Serumgewinnung fanden sich bei Gesunden und verschiedenartig Kranken verschiedene, jedoch bisher nicht erkennbar krankheitsspezifische Serum - m ξ - Cofaktor - Aktivitäten. Das Problem der exakteren Erfassung der m ξ -Cofaktor - Aktivität in verschiedenen Seren kann erst nach der besseren Normung der Fibrinogen - und Thrombinlösungen, sowie der Serumaktivierung (Kontaktaktivierung) zu lösen versucht werden.

2. Die Frage eines Nachweises von Antikörpern bzw. Autoantikörpern mit Hilfe des TEG bzw. der Meßgröße m ξ wurde untersucht.

Die Mischung von Zitratblutproben bzw. Zitratplasma von gruppengleichen normalen und Thrombopenie-Patienten führte bisher nicht zu sicher deutbaren Effekten.

3. Alpha- Heparine und Heparinoide wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf Humanblut im TEG unter besonderer Berücksichtigung von m ξ untersucht.

Im Metall des Thrombelastographen zeigen die heparinähnlichen Synthesetika bzw. Teilsynthesetika eine erheblich geringere Wirkung als in anderen Testen in vitro. Es ist noch nicht zu sagen, ob daraus Schlüsse auf die Wirkung der Substanzen in vivo gezogen werden können, weil in vivo die Kontaktoberflächen weder mit Metall noch mit Glas übereinstimmen.

4. Die Einwirkung von "Thrombo-Holzinger" (Thrombosol) auf die TEG - Werte wurde in vitro und an Kaninchen in vivo untersucht.

Es fanden sich mäßige Depressionen des m ξ -Wertes bei größeren i.v. -Dosen Thrombosol.

V. L I T E R A T U R

- 1) Hellige - Nachrichten Nr. 13, Juli 1954
- 2) Hartert, H.: "Die Thrombelastographie in der Differential-diagnose der hämorrhagischen Diathesen." Schw. Med. Wochenschrift, 1949, 577.
- 3) Sommer, S.: Med. Diss. München 1957.
- 4) Hartert, H., L. Lasch und Pfister: "Charakterisierung und Funktion eines Retraktions-Cofaktors." Zeitschrift "Thrombosis et Diathesis hämorrhagica", 15.12.57, Vol 1/No. 3/4
- 5) Jürgens, J. und F.K. Beller: "Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse." Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.
- 6) Jürgens, J.: "III. Symposium Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung", Frankfurt 1958, Schattauer-Verlag, Stuttgart.
- 7) Marx, R.: "Hämostaseologie", München 1956.
- 8) Miescher, P.: "Immunhämatologie der Thrombocyten." Allergische Immunreaktionen. In: "Immunpathologie in Klinik und Forschung" von Miescher, P. und K.O. Vorlaender. Thieme-Verlag, Stuttgart 1957.
- 9) Marx, R.: "Zur Kenntnis der für die Thrombusfestigkeit bedeutsamen Blutfaktoren; zugleich ein Beitrag zum Problem einer unspezifischen Blutstillungsförderung durch Transfusionen." Ergebnisse der Bluttransfusionsforschung III, Bibliotheca Haematologica Fasc. 6

- 10) Wuilleret, B., und W. Meyer: "Zur Nachweismethodik von antithrombocytären Substanzen im Plasma von Thrombopenie-Patienten." Zeitschrift "Blut", Band 3, Heft 4, Juli 1957.
- 11) "Antikörper im Serum nach Injektionen von Nativ-Heparin". Benend KG, Mitteilungen Nr. 5.
- 12) Matis, P. und W. Meyer: Referat: "Zur Thrombosetherapie und Prophylaxe mit dem Heparinoid Thrombocid."
- 13) Marx, R.: "Ein neues Antikoagulans und Antithromboticum vom Typ der Heparinkörper." Arzneimittelforschung - Sonderdruck 6, H. 11, 1956.
- 14) "Elheparin", Benend KG, Mitteilungen Nr. 7.
- 15) Hardegg, W., H. Hartert und G. Hieronymi: "Gerinnungsaktivität und Toxizität bei Heparinen und Heparinoiden." Klin. Wochenschrift 1.8.57, S. 778 - 782.
- 16) Reinhardt, F. und H. Riess: "Über die Beeinflussung der Blutgerinnung durch Polycarbonsäuren." Wiener Klin. Wochenschrift, Sonderdruck 1956, Nr. 41, S. 812 - 817.
- 17) Schreiber, W.: "Moderne Antikoagulantientherapie mit Polycarbonsäuren." Therapie der Gegenwart, Okt. 1955, Heft 10
- 18) Döpke, G.: "Klinische Erfahrungen über die gerinnungshemmende Wirkung eines Polycarbonsäurepräparates." Mü. Med. Wochenschrift, 1955, Nr. 37, S. 1218.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. R. Marx, Oberarzt an der I. med. Univ. Klinik in München, wie auch Herrn Prof. Dr. Schwiegk, Direktor der I. med. Univ. Klinik, danke ich für die Überlassung des Themas, für freundliche Unterstützung und wertvolle Ratschläge während der Durchführung der Arbeit und für die Erstellung des Referates, bzw. des Coreferates.

LEBENS LAUF

Am 14. Juli 1934 wurde ich, Inge Margit Sagel, als Tochter des Journalisten Peter Sagel und seiner Frau Anni geb. Giar in Frankfurt/Main geboren. Ich besuchte dort die Volksschule, später nach Übersiedlung meiner Eltern nach Kusel/Pfalz das Naturwissenschaftliche Gymnasium in Kusel. Dort legte ich im März 1953 die Reifeprüfung ab. Mein Medizinstudium begann ich im Sommer 1953 an der Universität Frankfurt und setzte es nach 2 Semestern in Heidelberg fort, wo ich im Sommer 1955 das Physikum bestand. Während meiner klinischen Semester studierte ich zunächst in Wien und Hamburg, dann in München, wo ich 4 Semester blieb und im Dezember 1958 die ärztliche Prüfung ablegte. Danach arbeitete ich 6 Monate an der II. med. Abteilung des Städt. Krankenhauses Am Biederstein in München und 5 Monate an der chirurgischen Abteilung des St. Joseph-Krankenhauses in Rüdesheim/Rhein. Am 15.3.60 legte ich in München die Doktorprüfung ab.

